

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 586**

51 Int. Cl.:

C07F 9/10 (2006.01) **C07C 51/29** (2006.01)

C07C 29/48 (2006.01) **C07F 9/09** (2006.01)

C07C 67/08 (2006.01)

C07C 67/28 (2006.01)

C07C 67/39 (2006.01)

C07C 41/26 (2006.01)

C07B 41/00 (2006.01)

C07C 45/27 (2006.01)

C07C 45/29 (2006.01)

C07C 51/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2008 E 08700247 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2125838**

54 Título: **Procedimiento mejorado para la preparación de fosfolípidos oxidados**

30 Prioridad:

09.01.2007 US 650973

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.06.2016

73 Titular/es:

**VASCULAR BIOGENICS LTD. (100.0%)
6 JONATHAN NETANYAHU STREET
60376 OR YEHUDA, IL**

72 Inventor/es:

**HALPERIN, GIDEON y
KOVALEVSKI-ISHAI, ETI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 574 586 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento mejorado para la preparación de fosfolípidos oxidados

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la química de síntesis, y más en particular, a nuevos procedimientos de síntesis útiles para la preparación de fosfolípidos oxidados, derivados, análogos y sales de los mismos.

- 10 En la técnica de la farmacología, se conocen fosfolípidos modificados en numerosas aplicaciones. En la patente de EE.UU. nº 5.985.292 se divulgan composiciones para aplicación transdérmica y transmembrana que incorporan fosfolípidos que soportan compuestos activos liposolubles. En las patentes de EE.UU. nº 6.261.597, 6.017.513 y 4.614.796 se divulgan derivados de fosfolípidos incorporados en liposomas y biovectores para administración de fármacos. En la patente de EE.UU. nº 5.660.855 se divulgan construcciones de lípidos de colesterol derivado con aminomanosa adecuado para dirigirse a células o tejidos de músculo liso, formulado en liposomas.
- 15 formulaciones están dirigidas a reducir la reestenosis en las arterias, usando procedimientos de PTCA.

- El uso de liposomas para tratar la aterosclerosis se ha divulgado adicionalmente en la solicitud de patente PCT publicada como WO-95/23.592. En la misma se divulgan composiciones farmacéuticas de liposomas unilaminares que pueden contener fosfolípidos. Los liposomas divulgados en el documento WO-95/23.592 están dirigidos a optimizar el flujo de colesterol de la placa aterosclerótica y normalmente son fosfolípidos no oxidados.
- 20

- Se sabe que los derivados de fosfolípidos modificados que emulan las estructuras del factor de activación de plaquetas (PAF) son farmacéuticamente activos, lo que afecta a funciones tales como la permeabilidad vascular, la presión arterial y la inhibición de la función cardíaca. En la patente de EE.UU. nº 4.778.912 se sugiere que un grupo de estos derivados tiene actividad anticancerosa.
- 25

- En la patente de EE.UU. nº 4.329.302 se divulgan compuestos de síntesis de éter 1-O-alquílico o fosfoglicéridos de 1-O-acilo graso que son derivados de la lisolecitina que pueden usarse como mediadores en la activación de plaquetas. En la patente de EE.UU. nº 4.329.302 se divulga que acilación de cadena corta de lisolecitina dio origen a compuestos con comportamiento de activación de plaquetas, en oposición a acilación de cadena larga, y que el éter 1-O-alquílico es superior en términos biológicos que los derivados de 1-O-acilo graso en la emulación de PAF.
- 30

- El efecto estructural de diversos fosfolípidos en la actividad biológica de los mismos ha sido investigado por Tokumura y col. (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Julio de 1981, Vol. 219, nº 1) y en la patente de EE.UU. nº 4.827.011, con respecto a la hipertensión.
- 35

- En la patente suiza CH-642.665 se divulgan derivados de éteres de fosfolípidos modificados que pueden tener algún efecto fisiológico.
- 40

- Davies y col. (J. Biol. Chem. 2001, 276:16015) enseñan el uso de fosfolípidos oxidados como agonistas de receptores activados por proliferadores de peroxisomas.

- En la patente de EE.UU. nº 6.838.452 y en el documento WO-04/106.486, del presente beneficiario, y en el documento WO-02/41.827 se divulga la preparación de fosfolípidos oxidados bien definidos, así como otros componentes LDL (lipoproteína de baja densidad) oxidados de síntesis. Los compuestos divulgados se definen como altamente efectivos en el tratamiento de la aterosclerosis y otras enfermedades relacionadas, así como enfermedades autoinmunitarias y trastornos inflamatorios. Se ha informado además de que los fosfolípidos oxidados regulan la respuesta inmunitaria a LDL oxidadas. Se ha informado además de que en general los fosfolípidos oxidados esterificados son superiores a los fosfolípidos oxidados esterificados comparables como agentes terapéuticos.
- 45
- 50

- La oxidación de fosfolípidos tiene lugar *in vivo* a través de la acción de radicales libres y reacciones enzimáticas abundantes en placa ateromatosa. *In vitro*, la preparación de fosfolípidos oxidados suele conllevar una oxidación química simple de una LDL nativa o de un componente de fosfolípidos de LDL. Los investigadores que estudian el papel de las LDL oxidadas han empleado, por ejemplo, iones ferrosos y ácido ascórbico (Itabe, H., y col., J. Biol. Chem. 1996; 271:33208-217) y sulfato de cobre (George, J. y col., Atherosclerosis. 1998; 138:147-152; Ameli, S. y col., Arteriosclerosis Thromb Vase Biol 1996; 16:1074-79) para producir moléculas de fosfolípidos oxidadas o ligeramente oxidadas similares a las asociadas con los componentes de placa. Análogamente se ha demostrado que
- 55

las moléculas preparadas son idénticas a los autoantígenos asociados con la aterogenia (Watson A. D. y col., J. Biol. Chem. 1997; 272:13597-607) y son capaces de inducir tolerancia inmunitaria antiaterógena protectora (solicitud de patente de EE.UU. n° 09/806.400 de Shoenfeld y col., presentada el 30 de septiembre de 1999) en ratones. Análogamente, en la patente de EE.UU. n° 5.561.052, se divulga un procedimiento para la producción de lípidos y fosfolípidos oxidados que usan sulfato de cobre y superóxido dismutasa para producir ácidos araquidónico o linoleico oxidados y LDL oxidadas para uso diagnóstico.

Las técnicas de oxidación descritas anteriormente para preparar fosfolípidos oxidados implican reacciones que son inespecíficas y producen una mezcla de productos oxidados. La inespecificidad de las reacciones reduce el rendimiento, requiere una etapa de separación adicional y suscita inquietud acerca de los efectos secundarios no deseados cuando los productos se integran en composiciones farmacéuticas.

La 1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-sn-glicero-3-fosfocolina (POVPC) y derivados del mismo tales como 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina (PGPC) son ejemplos representativos de fosfolípidos esterificados ligeramente oxidados que han sido estudiados en relación con la aterogenia (véase, por ejemplo, Boullier y col., J. Biol. Chem. 2000, 275:9163; Subbanagounder y col., Circulation Research, 1999, pág. 311). También se ha estudiado el efecto de diferentes análogos estructurales que pertenecen a esta clase de fosfolípidos oxidados (véase, por ejemplo, Subbanagounder y col., Arterioscler. Thromb. Nasc. Biol. 2000, pág. 2248; Leitinger y col., Proc. Nat. Ac. Sci. 1999, 96:12010).

La POVPC se prepara normalmente mediante el suministro de una fosfatidilcolina que contiene un ácido graso insaturado y la oxidación del enlace insaturado del ácido graso, por ejemplo, por ozonólisis (escisión oxidativa) o mediante el uso de un peryodato como agente oxidante. Dicha ruta de síntesis implica normalmente una síntesis en varias etapas y requiere la separación de la mayor parte de los productos intermedios formados por medio de cromatografía en columna.

Tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.838.452 citada anteriormente, los fosfolípidos oxidados esterificados se han preparado análogamente oxidando un enlace insaturado de un ácido graso unido a una estructura principal de fosfolípido. Más en particular, los fosfolípidos oxidados esterificados se prepararon, de acuerdo con las enseñanzas de esta patente, introduciendo un ácido graso corto insaturado en un glicerolípido, introduciendo una fracción de fosfato en el producto intermedio obtenido y oxidando el enlace insaturado en la cadena de ácido graso por medio de (i) peróxido de hidrógeno y ácido fórmico, de manera que se obtiene un diol, seguido por peryodato de potasio, de manera que se obtiene un aldehído; o (ii) ozonólisis. Si bien la escisión oxidativa del enlace insaturado produce una fracción de aldehído, otras fracciones oxidadas (por ejemplo, ácido carboxílico, acetal, etc.) se obtuvieron mediante oxidación adicional de la fracción de aldehído. Dicha ruta de síntesis en varias etapas se caracteriza a menudo por rendimientos globales relativamente bajos y, de nuevo, requiere la separación de la mayoría de los productos intermedios formados por medio de cromatografía en columna.

Se ha encontrado que las aplicaciones *in vivo* que emplean fosfolípidos oxidados esterificados preparados como anteriormente presentan el inconveniente de la susceptibilidad al reconocimiento, la unión y el metabolismo del componente activo en el organismo, lo que convierte a la posología y la estabilidad después de la administración en una consideración importante. Los fosfolípidos oxidados esterificados, como los descritos en la patente de EE.UU. n° 6.838.452 y en el documento WO-04/106.486, muestran alta bioestabilidad y elevada actividad terapéutica.

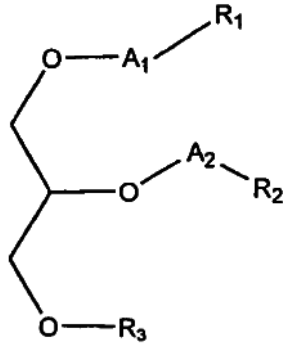
Así, los procedimientos conocidos en la actualidad de preparación de fosfolípidos oxidados esterificados y no esterificados implican complejos procedimientos de varias etapas adecuados para preparación en laboratorio que hacen la preparación a escala industrial ineficaz y compleja. En particular, estos procedimientos de varias etapas requieren técnicas de separación inaplicables industrialmente tales como la cromatografía en columna durante las diversas fases del procedimiento de síntesis.

A la vista de la actividad terapéutica beneficiosa de los fosfolípidos oxidados en general y de los fosfolípidos oxidados esterificados en particular, existe una necesidad ampliamente reconocida de ellos y resultará altamente ventajoso tener un procedimiento mejorado para la preparación de fosfolípidos oxidados esterificados desprovistos de al menos algunos de los inconvenientes de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento tal como se define en las reivindicaciones adjuntas de preparación de un compuesto que tiene un compuesto de glicerol y al menos una fracción oxidada unida

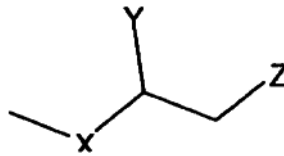
a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter, teniendo el compuesto la Fórmula general II:



5

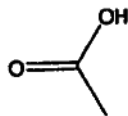
Fórmula II

donde: A₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₂ y C=O; A₂ es CH₂; R₁ es un alquilo que tiene 1-30 átomos de carbono; R₂ es



10

mientras: X es una cadena de alquilo que tiene 1-24 átomos de carbono; Y es hidrógeno; y Z es

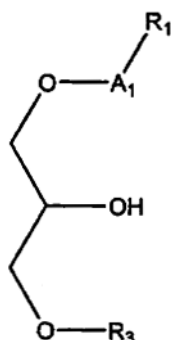


15

y R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, ácido fosfórico, fosforilcolina, fosfoiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcardiolipina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosfoiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosfoiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bisfosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina, fosfoglicerol, comprendiendo el procedimiento:

suministro de un primer compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un grupo hidroxilo libre, teniendo el primer compuesto la Fórmula general I:

25



Fórmula I;

- 5 suministro de un segundo compuesto que tiene al menos un enlace insaturado y al menos un grupo de reacción capaz de formar un enlace de éter con el grupo hidroxilo libre; reacción del primer compuesto y el segundo compuesto para obtener así un tercer compuesto, teniendo el tercer compuesto la estructura principal de glicerol y un residuo que contiene un enlace insaturado que está unido a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter en la posición *sn*-2; aislamiento del tercer compuesto, para obtener así un tercer compuesto
- 10 purificado; reacción del tercer compuesto purificado con un agente oxidante, para obtener así un cuarto compuesto, teniendo el cuarto compuesto la estructura principal de glicerol y un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter en la posición *sn*-2; y aislamiento del cuarto compuesto para obtener así un cuarto compuesto purificado, obteniendo así el compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de
- 15 glicerol por medio de un enlace de éter, estando el procedimiento desprovisto de cromatografía en columna.

El aislamiento del tercer compuesto comprende: recogida del tercer compuesto; suministro de una solución del tercer compuesto en un disolvente, estando el disolvente seleccionado de manera que el tercer compuesto es soluble en el mismo cuando las impurezas formadas durante la reacción son insolubles en el mismo, para proporcionar así una

20 mezcla que incluye la solución del tercer compuesto en el disolvente e impurezas insolubles; eliminación de las impurezas insolubles; y eliminación del disolvente, obteniendo así el tercer compuesto purificado.

La fracción oxidada se selecciona de entre el grupo que consiste en un ácido carboxílico y un éster.

- 25 El agente oxidante comprende una mezcla de un peryodato y un permanganato.

De acuerdo con características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la reacción del tercer compuesto purificado con un agente oxidante se efectúa en presencia de una base.

- 30 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas donde R_3 es hidrógeno, comprendiendo el procedimiento además, antes de la reacción del primer compuesto y el segundo compuesto: protección de un grupo hidroxilo libre en la posición *sn*-3 de la estructura principal de glicerol con un grupo protector.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el compuesto que tiene una

35 estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol comprende además una fracción que contiene fósforo unido a la estructura principal de glicerol, de manera que R_3 se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcardiolipina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol,

40 fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bisfosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentiaramina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina, fosfoglicerol, comprendiendo el procedimiento además, después del aislamiento del cuarto compuesto: reacción del cuarto compuesto purificado con una fracción que contiene fósforo, para obtener así el compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de

45 glicerol y que tiene además una fracción que contiene fósforo unido a la estructura principal de glicerol.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la al menos una fracción que contiene fósforo es una fracción de fosfato que está unida a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de fosfodiéster.

5

La reacción del cuarto compuesto purificado con la fracción que contiene fósforo comprende: suministro del cuarto compuesto purificado que tiene un grupo hidroxilo libre; reacción del cuarto compuesto purificado con un compuesto de reacción que contiene fósforo que tiene un segundo grupo de reacción y un tercer grupo de reacción, siendo el segundo grupo de reacción capaz de reaccionar con el grupo hidroxilo libre y un segundo grupo de reacción, para proporcionar así el primer compuesto, el tercer compuesto, el tercer compuesto purificado, el cuarto compuesto o el cuarto compuesto purificado que tiene un grupo de reacción que contiene fósforo unido a la estructura principal de glicerol; y conversión del grupo de reacción que contiene fósforo en la fracción que contiene fósforo.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el compuesto de reacción que contiene fósforo es oxiclورو de fósforo (POCl_3).

15

La presente invención aborda acertadamente los inconvenientes de las configuraciones conocidas en la actualidad mediante el suministro de nuevas rutas de síntesis que pueden usarse beneficiosamente en la preparación a mayor escala de fosfolípidos oxidados.

20

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que se dirige la presente invención. Aunque en la práctica o la comprobación de la presente invención pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, regirá la memoria descriptiva de la patente, que incluye las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

25

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva el término "mezcla" describe una mezcla que incluye más de un sustancia y que puede estar en cualquier forma, por ejemplo, como una solución homogénea, una suspensión, una dispersión, una solución bifásica y otros.

30

Tal como se usa en la presente solicitud, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural salvo que del contexto se desprenda lo contrario.

35

A lo largo de esta descripción, pueden presentarse diversos aspectos de la presente invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo se ofrece simplemente por comodidad y brevedad y no debe entenderse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de una intervalo ha de describir específicamente todos los subintervalos posibles así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo como, por ejemplo de 1 a 6 contiene específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica con independencia de la amplitud del intervalo.

40

Siempre que se indique un intervalo numérico en la presente memoria descriptiva, se pretende incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que está comprendido en/entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que está comprendido en/desde" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en la presente memoria descriptiva de forma indistinta y se entiende que incluyen los números indicados primero y segundo y todos los números fraccionarios y enteros intermedios.

50

Tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, los términos "que comprende", "que incluye" y "que contiene" significa que pueden añadirse otras etapas e ingredientes que no afectan al resultado final. Estos términos comprenden los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

55

La frase "que consiste esencialmente en" significa que la composición o procedimiento puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero sólo si los ingredientes y/o etapas adicionales no modifican materialmente las características básicas y novedosas de la composición o el procedimiento reivindicados.

El término "procedimiento" o "proceso" se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea dada lo que incluye, pero no se limita a, aquellas formas, medios, técnicas y procedimientos ya conocidos, o fáciles de desarrollar a partir de las formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de la química, la farmacología, la biología, la bioquímica y la medicina.

5

El término "fosfolípido" se usa en la presente memoria descriptiva para describir colectivamente los compuestos que incluyen un grupo lipídico no polar y un grupo fosfato de extremo altamente polar. En la naturaleza de la familia de los compuestos de fosfolípidos una característica y muy dominante es la familia de compuestos fosfoglicéridos. Por tanto, el término "fosfolípido" se usa normalmente a lo largo de la presente memoria descriptiva para describir los

10 fosfoglicéridos, a menos que se indique lo contrario.

Por tanto el término "fosfoglicérido" se usa en la presente memoria descriptiva para describir compuestos que tienen una estructura principal de glicerol, una o más fracciones de lípidos y uno o más grupos terminales de fosfato, que están unidos a la estructura principal de glicerol. La mayor parte de los glicerolípidos de ocurrencia natural incluyen

15

dos fracciones de lípidos unidas a las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 y una fracción de fosfato unida a la posición *sn*-3 de la estructura principal de glicerol.

Por tanto el término "fosfolípido oxidado" se usa en la presente memoria descriptiva para describir un fosfolípido, así como un fosfoglicérido, que incluye una o más fracciones oxidadas, tal como se describe este término en lo sucesivo. Normalmente, en fosfolípidos oxidados, la fracción oxidada se incluye dentro de una fracción lipídica.

20

El término "glicerolípido" describe un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y una o dos fracciones de lípidos unidas a la misma. Las fracciones de lípidos pueden estar unidas a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éster y/o un enlace de éter.

25

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "lípidos" describe un residuo de hidrocarburo que tiene de 3 a 30 átomos de carbono. En compuestos de ocurrencia natural, los lípidos en los fosfolípidos y los glicerolípidos son derivados de ácidos grasos y por tanto están unidos a la estructura principal por medio de un enlace O-acilo (éster). En la presente memoria descriptiva, la fracción lipídica puede estar unida a la estructura

30

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "monoesterificado" y "diesterificado" con respecto a los fosfolípidos o los glicerolípidos, describen fosfolípidos o glicerolípidos, ya sean oxidados o no oxidados, en los que una o dos de las fracciones de lípidos, respectivamente, están unidas a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace éster (por ejemplo, O-acilo graso).

35

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "monoeterificado" y "dieterificado" con respecto a los fosfolípidos o los glicerolípidos, describen fosfolípidos o glicerolípidos, ya sean oxidados o no oxidados, en los que una o dos de las fracciones de lípidos, respectivamente, están unidas a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter.

40

El término "fosfoglicerol" describe un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y un grupo fosfato unido a una posición del mismo.

El término "fosfoglicérido" describe un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol, con una o dos fracciones de lípidos y una fracción de fosfato unidas al mismo.

45

El término "fosfoglicérido monoeterificado" describe un fosfoglicérido, en el que una fracción de lípido está unida a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter.

50

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "fracción" describe una sustancia o grupo funcional que forma parte de un compuesto.

El término "residuo" como es bien conocido en la técnica se usa para describir una parte importante de una molécula que está enlazada con otra molécula.

55

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos de preparación de fosfolípidos oxidados que pueden

usarse con eficacia para una producción a mayor escala de dichos fosfolípidos oxidados. Específicamente, la presente invención se refiere a nuevos procedimientos de introducción de una fracción oxidada en un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y se refiere además a nuevos procedimientos para introducir una fracción que contiene fósforo en dicho compuesto. Los nuevos procedimientos descritos en la presente memoria
5 descriptiva están desprovistos de cromatografía en columna y normalmente usan reactivos disponibles comercialmente y respetuosos con el medio ambiente.

Los principios y el funcionamiento de los nuevos procedimientos de síntesis de acuerdo con la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a las descripciones adjuntas.

10 Antes de explicar en detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción de realizaciones preferidas o ilustradas por los Ejemplos. La invención puede adaptarse a otras realizaciones o ponerse en práctica o efectuarse de diversas formas.

15 Tal como se ha expuesto anteriormente, recientemente se ha informado de que fosfolípidos oxidados bien definidos preparados por síntesis pueden regular la respuesta inmunitaria a LDL oxidadas y son así altamente efectivos en el tratamiento de la aterosclerosis y las enfermedades relacionadas, así como las enfermedades autoinmunitarias y los trastornos inflamatorios. Se ha informado además de que, en general, los fosfolípidos oxidados esterificados son
20 superiores a los fosfolípidos oxidados esterificados comparables como agentes terapéuticos.

Estos fosfolípidos oxidados altamente beneficiosos incluyen normalmente una estructura principal de glicerol, a la que se unen un residuo de lípido, un residuo de fosfato y un residuo de lípido que contiene una fracción oxidada, tal como se describe en detalle, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.838.452 y en el documento WO-04/106.486.

25 Tal como se expone además anteriormente, los procedimientos conocidos en la actualidad de preparación de dichos fosfolípidos oxidados de síntesis bien definidos implican síntesis en varias etapas. Si bien se ha encontrado que estas síntesis en varias etapas son relativamente eficientes, lo que produce un rendimiento moderado o bueno, estos procedimientos están limitados por la necesidad de realizar procedimientos laboriosos de aislamiento y
30 purificación de los diversos productos intermedios formados durante las síntesis. En particular, estos procedimientos implican normalmente técnicas tales como la cromatografía en columna, que, como conocen bien los expertos en la materia, es industrialmente inaplicable, o al menos ineficaz en términos de coste, complejidad y uso de cantidades excesivas de disolventes orgánicos, que pueden ser peligrosos y exigen un cuidado especial de la eliminación de
35 residuos. La necesidad de usar cromatografía en columna en estos procedimientos procede del hecho de que los productos intermedios, así como los productos finales formados durante estas síntesis en varias etapas, no pueden aislarse y/o purificarse por técnicas más convencionales como extracción, cristalización y similares.

Dado que estos fosfolípidos oxidados preparados por síntesis muestran una actividad terapéutica excepcionalmente beneficiosa, es muy conveniente preparar estos compuestos en un alto nivel de pureza. Además, dado que la
40 preparación de dichos fosfolípidos oxidados implica síntesis en varias etapas, se requiere la purificación de los productos intermedios con el fin de realizar dicho procedimiento con rendimientos razonables y una cantidad mínima de productos secundarios.

En la busca de nuevos procedimientos de preparación de fosfolípidos oxidados, que podrían usarse eficazmente en
45 la producción a mayor escala de estos compuestos, a la vez que se evita la necesidad de usar técnicas laboriosas como la cromatografía en columna, los autores de la presente invención han diseñado y aplicado con éxito nuevas metodologías de síntesis para introducir un fracción oxidada y/o una fracción de fosfato en compuestos que tienen una estructura principal de glicerol, lo que evita el uso desventajoso de la cromatografía en columna y que produce un rendimiento relativamente elevado de compuestos puros. Los procedimientos descritos en la presente memoria
50 descriptiva usa además normalmente reactivos no peligrosos disponibles comercialmente, lo que proporciona además la aplicabilidad industrial de los mismos.

La nueva metodología de síntesis descrita en la presente memoria descriptiva puede exponerse del modo siguiente:

55 (i) un nuevo procedimiento de introducción de una fracción oxidada en un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol, por medio de la introducción directa de la fracción oxidada y la oxidación de la fracción insaturada, con lo que dicha oxidación se realiza directamente y permite el aislamiento y purificación del producto oxidado por medios sencillos de separación de fases; que puede incluir:

(ii) un nuevo procedimiento de introducción de una fracción de fosfato en un glicerólípido que tiene opcionalmente una fracción oxidada o preoxidada unida al mismo, por medio de la introducción de un grupo de reacción que contiene fósforo.

5 Debido al rendimiento superior de fosfolípidos oxidados en los que el residuo que contiene una fracción oxidada está unido a la estructura principal por medio de un enlace de éter, estos procedimientos están todos dirigidos a la unión del residuo que contiene una fracción oxidada a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter.

Tal como se demuestra en la sección de Ejemplos que se ofrece más adelante, al usar de estas metodologías, se han preparado con éxito fosfolípidos oxidados bien definidos en un rendimiento y una pureza relativamente altos.

Así, de acuerdo con un aspecto de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas se proporciona un procedimiento de preparación de un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter, que está desprovisto de cromatografía en columna. El procedimiento, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se efectúa por:

suministro de un primer compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un grupo hidroxilo libre;

20 suministro de un segundo compuesto que tiene al menos un enlace insaturado y al menos un grupo de reacción capaz de formar un enlace de éter con dicho grupo hidroxilo libre;

reacción del primer compuesto y el segundo compuesto para obtener así un tercer compuesto, que tiene una estructura principal de glicerol y un residuo que contiene un enlace insaturado que está unido a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter;

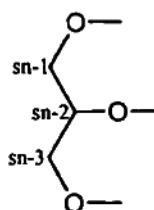
aislamiento del tercer compuesto, para obtener así un tercer compuesto purificado;

30 reacción del tercer compuesto purificado con un agente oxidante, para obtener así un cuarto compuesto, que tiene una estructura principal de glicerol y un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter; y

aislamiento del cuarto compuesto para obtener así un cuarto compuesto purificado, obteniendo así el compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter.

Tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, la frase "un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol", que se refiere también en la presente memoria descriptiva indistintamente como "un compuesto glicerólico" o un "compuesto de glicerol" describe un compuesto que incluye el siguiente esqueleto:

40



Cuando el compuesto es glicerol, cada una de las posiciones glicerólicas *sn-1*, *sn-2* y *sn-3* es sustituida por un grupo hidroxilo libre.

45

Tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, las frases "fracción oxidada" y "un residuo que contiene una fracción oxidada", que se usan en la presente memoria descriptiva indistintamente, describen un ácido carboxílico o éster carboxílico. Las frases "un compuesto que tiene un residuo que contiene una fracción oxidada" y "un compuesto que contiene una fracción oxidada" se usan también en la presente memoria descriptiva indistintamente.

50

El procedimiento de acuerdo con la presente invención se basa en introducir una fracción insaturada en el compuesto glicerólico y someter al enlace insaturado a escisión oxidativa. Sin embargo, aunque en las síntesis conocidas en la actualidad de fosfolípidos glicerólicos oxidados se ha empleado esta ruta de síntesis, los autores de la presente invención han diseñado y aplicado con éxito un procedimiento en el que el compuesto glicerólico que tiene una fracción oxidada unida al mismo puede ser aislado y purificado sin usar cromatografía en columna.

La introducción de la fracción insaturada en el compuesto glicerólico se realiza normalmente usando procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.838.452.

10 Como material de partida se selecciona un primer compuesto, que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un grupo hidroxilo libre.

Se obtiene un compuesto que tiene una fracción insaturada y un primer grupo de reacción, que se refiere también en la presente memoria descriptiva como segundo compuesto, comercialmente o usando procedimientos conocidos en la técnica, y se hace reaccionar con el material de partida glicerólico.

El primer grupo de reacción se selecciona como capaz de reaccionar con el grupo hidroxilo libre. La reacción con el grupo hidroxilo libre de manera que se forma un enlace de éter se realiza normalmente por medio de un mecanismo nucleófilo y por tanto el primer grupo de reacción se caracteriza preferentemente como un buen grupo saliente y puede ser, por ejemplo, haluro, sulfonato, y cualquier otro grupo saliente.

Preferentemente, el grupo de reacción es haluro y más preferentemente, es bromuro.

El segundo compuesto se selecciona preferentemente de manera que la fracción insaturada está presente en una posición de extremo de la misma, con lo cual se facilita la reacción de oxidación que se ofrece a continuación. Por "fracción insaturada" se entiende en la presente memoria descriptiva una fracción que incluye al menos dos átomos de carbono que están unidos entre sí por un enlace insaturado, por ejemplo, un doble enlace o un triple enlace, preferentemente un doble enlace.

Más preferentemente, el segundo compuesto comprende de 4 a 30 átomos de carbono, más preferentemente de 4 a 27 átomos de carbono, más preferentemente de 4 a 16 átomos de carbono, más preferentemente de 4 a 10 átomos de carbono, más preferentemente de 4 a 8 átomos de carbono, y con la máxima preferencia el segundo compuesto comprende 6 átomos de carbono.

La reacción del primer compuesto y el segundo compuesto descrita en la presente memoria descriptiva se realiza normalmente en presencia de una base. Las bases adecuadas para su uso en este contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de bario e hidróxido de potasio.

La reacción del primer compuesto y el segundo compuesto se realiza normalmente en presencia de un disolvente. Los disolventes adecuados para su uso en este contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, disolvente no polares como éter de petróleo, hexano, benceno y tolueno.

Con el fin de llevar a cabo la reacción selectivamente, es decir, introduciendo la fracción insaturada en una posición determinada de la estructura principal de glicerol, es preciso proteger un grupo hidroxilo libre distinto que la reacción de hidroxilo, si estuviera presente, antes de la reacción.

Así, en estos casos, el procedimiento de acuerdo con este aspecto de la presente invención comprende además de forma opcional y preferente, antes de la reacción del primer compuesto y el segundo compuesto, la protección de los grupos hidroxilo libres adicionales que pueden estar presentes en el primer compuesto.

En este contexto de la presente invención puede usarse cualquiera de los grupos protectores de hidroxilo conocidos. De acuerdo con una realización preferida de este aspecto de la presente invención, el grupo protector es tritilo.

El tritilo es un grupo de volumen, que sirve normalmente como grupo protector selectivo, debido al impedimento estérico. Así, si bien la reacción de un compuesto glicerólico tiene más de un grupo hidroxilo libre, normalmente, el grupo tritilo se haría reaccionar con el grupo con menor impedimento estérico.

Tal como se observa anteriormente y se expone más en detalle en la patente de EE.UU. n° 6.838.452 y en el

documento WO-04/106.486, la posición de la estructura principal de glicerol a la que se une una fracción oxidada influye en la actividad del compuesto. Por tanto es altamente beneficioso realizar la preparación de los compuestos glicéricos descritos en la presente memoria descriptiva selectivamente, de manera que el residuo que contiene una fracción oxidada estaría unido a la posición deseada. Tal como se demuestra adicionalmente en la patente de 5 EE.UU. n° 6.838.452, los fosfolípidos oxidados que tienen un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la posición *sn*-2 de la estructura principal de glicerol muestran un rendimiento superior.

Para este fin, el uso de grupo tritilo como grupo protector mientras se introduce el segundo compuesto descrito anteriormente en la estructura principal de glicerol es altamente beneficioso, dado que debido a su volumen, se 10 llevaría a cabo la protección de los grupos terminales hidroxilo, en la posición *sn*-3, dejando el grupo hidroxilo en *sn*-2 disponible para posteriores sustituciones.

Una vez completada la reacción entre el primer compuesto y el segundo compuesto, se obtiene una mezcla de reacción que contiene un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y un residuo que contiene una 15 fracción insaturada unida al mismo por medio de un enlace de éter. Dicho compuesto se refiere también en la presente memoria descriptiva indistintamente como tercer compuesto.

Dependiendo del material de partida usado, el tercer compuesto puede incluir además uno o más grupos protectores, que protegen los grupos hidroxilo libres que pueden estar presentes en la estructura principal de 20 glicerol.

A continuación se aísla el tercer compuesto, ya esté protegido o desprotegido, de la mezcla de reacción y se trata de manera que se obtiene un compuesto purificado.

25 El aislamiento del tercer compuesto se realiza primero recogiendo el tercer compuesto formado. La recogida del tercer compuesto se realiza normalmente usando técnicas convencionales tales como extracción, eliminación del disolvente, filtración y similares, que incluyen cualquier combinación de las mismas. Una vez recogido, el producto en bruto se disuelve en un disolvente, con lo que el disolvente se selecciona de manera que el tercer compuesto es soluble en el mismo cuando las impurezas formadas durante la reacción entre los compuestos primero y segundo 30 son insolubles en el mismo.

El término "impurezas" se usa en la presente memoria descriptiva para describir cualquier sustancia que está presente en el producto en bruto final y no es el producto en sí e incluyen, por ejemplo, materiales de partida sin reaccionar y productos secundarios. 35

Usando dicho disolvente, se obtiene una mezcla que incluye una solución del tercer compuesto en dicho disolvente y sustancias insolubles. Los disolventes para su uso en este contexto de la presente invención son disolventes no polares como éter de petróleo, hexano, benceno, heptano y tolueno. Preferentemente, el disolvente es éter de petróleo. Más preferentemente, el disolvente es hexano. 40

A continuación se eliminan las impurezas insolubles de la mezcla, preferentemente por filtración, se elimina el disolvente y se obtiene un tercer compuesto purificado a la vez que se evita la necesidad de usar cromatografía en columna en el procedimiento de purificación de los mismos.

45 A continuación se hace reaccionar el tercer compuesto purificado con un agente oxidante, de manera que se oxide la fracción insaturada y se obtenga así un cuarto compuesto, en el que un residuo que contiene una fracción oxidada se une a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "peróxido" describe un compuesto que tiene la fórmula XIO_4 , donde X puede ser hidrógeno (para ácido periódico) o un catión monovalente de un metal (por ejemplo, sodio, potasio). Un peróxido preferido es peróxido de sodio ($NaIO_4$). 50

El término "permanganato" describe un compuesto que tiene la fórmula $XMnO_4$, donde X puede ser hidrógeno o un catión monovalente de un metal (por ejemplo, sodio, potasio). Un permanganato preferido es permanganato de 55 potasio ($KMnO_4$).

Tal como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y cadena ramificada. Preferentemente, el grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbono.

Un grupo "cicloalquilo" se refiere un anillo fusionado o monocíclico de sólo carbono (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos de carbono) donde uno o más de los anillos no tienen un sistema de electrones pi totalmente conjugado. Los ejemplos, sin limitación, de grupos cicloalquilo son ciclopropano, ciclobutano, 5 ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexadieno, cicloheptano, cicloheptatrieno y adamantano.

Un grupo "arilo" se refiere a grupos policíclicos de anillo fusionado o monocíclicos de sólo carbono (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) que tienen un sistema de electrones pi totalmente conjugado. Los ejemplos, sin limitación, de grupos arilo son fenilo, naftalenilo y antraceno.

10 Los términos "oxialquilo", "oxicicloalquilo" y "oxiarilo" describen un grupo $R'-C(=O)-$, en el que R' es alquilo, cicloalquilo o arilo, respectivamente, de manera que el peróxido es un ácido peroxicarboxílico.

15 Los autores de la presente invención han descubierto además que puede obtenerse fácilmente un cuarto compuesto que tiene un ácido carboxílico como una fracción oxidada mediante reacción del tercer compuesto descrito en la presente memoria descriptiva con una mezcla de un peryodato y un permanganato como agente oxidante.

20 La conversión del tercer compuesto directamente a un compuesto que contiene ácido carboxílico es altamente beneficiosa dado que evidentemente hace el procedimiento en su conjunto más eficiente al reducir el número de etapas de síntesis y evitar además la necesidad de purificar los productos intermedios formados durante el proceso de oxidación. Además, el agente oxidante usado en esta ruta comprende agentes seguros no peligrosos.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, la fracción oxidada es ácido carboxílico y la oxidación del tercer compuesto se efectúa mediante reacción del tercer compuesto con una mezcla de un peryodato y un permanganato.

25 Dicha reacción se realiza preferentemente en presencia de una base. Las bases preferidas que son adecuadas para su uso en esta realización de la presente invención incluyen carbonato de sodio y bicarbonato de sodio.

30 En casos en los que el cuarto compuesto obtenido tiene un grupo protector, tal como se describe anteriormente, una vez que se obtiene, se aísla y opcionalmente se purifica el cuarto compuesto, el grupo protector se elimina.

En casos en los que la fracción oxidada es un ácido carboxílico, el cuarto compuesto puede aislarse fácilmente al eliminar el grupo protector y obtener un compuesto que tiene una fracción carboxílica y una fracción hidroxilada.

35 Análogamente al procedimiento descrito anteriormente para aislamiento y purificación del tercer compuesto, el cuarto compuesto puede purificarse fácilmente disolviéndolo en un disolvente, con lo que el disolvente se selecciona de manera que el cuarto compuesto sea soluble en el mismo cuando las impurezas formadas durante el proceso de oxidación son insolubles en el mismo.

40 Por otra parte, dicho disolvente puede seleccionarse de manera que el cuarto compuesto sea soluble en el mismo con lo que el protector es insoluble en el mismo. Así, al realizar la eliminación del grupo protector en condiciones que implican a dicho disolvente se permite la eliminación del grupo protector y de las impurezas formadas durante la reacción de oxidación dentro de la misma etapa de síntesis.

45 Usando dicho disolvente, se obtiene una mezcla que incluye una solución del cuarto compuesto en dicho disolvente y sustancias insolubles como impurezas y el grupo protector. Los disolventes adecuados para su uso en este contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, disolventes no polares como éter de petróleo, hexano, benceno, heptano y tolueno, disolventes semipolares como acetato de etilo y mezclas de los mismos. Preferentemente, el disolvente es éter de petróleo o hexano y/o una mezcla de los mismos con acetato de etilo.

50 A continuación se eliminan las impurezas insolubles de la mezcla, preferentemente por filtración, se extrae el disolvente y se obtiene un cuarto compuesto purificado a la vez que se evita la necesidad de usar cromatografía en columna en el procedimiento de purificación de los mismos y se elimina además la necesidad de múltiples procedimientos de purificación de los diversos productos intermedios formados.

55 En casos en que la fracción oxidada es un éster, el proceso se efectúa por suministro de un compuesto que contiene ácido carboxílico y a continuación la conversión del ácido carboxílico en el éster. Esto puede efectuarse fácilmente, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. En la sección de Ejemplos que se ofrece a continuación se describen procedimientos de ejemplo.

Tal como se expone anteriormente, los compuestos que tienen una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol y que tienen además una fracción que contiene fósforo unido a la estructura principal de glicerol, preferentemente una fracción que contiene fosfato, se conocen como fosfolípidos oxidados y son altamente beneficiosos en el tratamiento de diversos trastornos. Así, el proceso descrito en la presente memoria descriptiva opcionalmente y preferentemente comprende además la introducción de dicha fracción que contiene fósforo en la estructura principal de glicerol.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "fracción que contiene fósforo" describe una fracción, tal como se define en la presente memoria descriptiva, que incluye fosfatos y pirofosfatos.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva el término "fosfonato" describe un grupo $-P(=O)(OR')(OR'')$, donde R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, o alquilo, cicloalquilo o arilo sustituidos o sin sustituir, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

El término "fosfinilo" describe un grupo $-PR'R''$, con R' y R'' tal como se define anteriormente.

El término "óxido de fosfina" describe un grupo terminal $-P(=O)(R')(R'')$ o un grupo de unión $-P(=O)(R')-$, del modo en que estas frases se han definido anteriormente, con R' y R'' tal como se define en la presente memoria descriptiva.

El término "pirofosfato" describe un grupo $-O-P(=O)(OR')(O-P(=O)(OR')(OR''))(OR''')$, con R', R'' tal como se define en la presente memoria descriptiva, y R''' se define como R' o R''.

El término "fosfito" describe un grupo $-O-PH(=O)(OR')$, con R' tal como se define en la presente memoria descriptiva.

El término "fosfato" describe un grupo $-O-P(=O)_2(OR')$, con R' tal como se define en la presente memoria descriptiva.

El término "tiofosfato" describe un grupo $-O-P(=O)(=S)(OR')$, con R' tal como se define en la presente memoria descriptiva.

La introducción de una fracción que contiene fósforo en un compuesto que tiene un compuesto glicerólico se realiza por:

reacción del cuarto compuesto purificado descrito anteriormente, con una fracción que contiene fósforo, de manera que se obtenga un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol y que tiene además una fracción que contiene fósforo unido a la estructura principal de glicerol.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la fracción que contiene fósforo es una fracción de fosfato que está unida a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de fosfodiéster.

La fracción que contiene fósforo se selecciona de entre ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bisfosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenilfosfoetanolamina y fosfoglicerol.

La fracción que contiene fósforo está unida a la posición *sn*-3 de la estructura principal de glicerol y así, la introducción de dicha fracción se realiza selectivamente, mediante protección adecuada de otros grupos hidroxilo libres que están presentes en la reacción de compuesto o desprotección de un grupo hidroxilo protegido en la posición deseada.

En los procedimientos de preparación de fosfolípidos oxidados conocidos en la actualidad, la fracción que contiene fósforo se introduce normalmente antes del suministro de un compuesto que contiene una fracción oxidada.

Además, en casos en que la fracción que contiene fósforo es fosforilcolina, una fracción ampliamente usada y beneficiosa en dichos compuestos, los procedimientos conocidos en la actualidad implican reacciones de N-alquilación, que implican reactivos peligrosos no respetuosos con el medio ambiente como, por ejemplo, trimetilamina.

Los autores de la presente invención han descubierto ahora que (i) una fracción que contiene fósforo puede ser introducida fácilmente después del suministro de un compuesto que contiene una fracción oxidada; y (ii) la introducción de la fracción que contiene fósforo puede realizarse eficazmente por medio de un producto intermedio de reacción que contiene fósforo.

Este procedimiento, combinado con el procedimiento descrito anteriormente para preparar el compuesto que contiene la fracción oxidada, puede usarse de forma beneficiosa para preparar los fosfolípidos oxidados terapéuticamente beneficiosos descritos anteriormente.

La introducción de una fracción que contiene fósforo en un compuesto glicerólico se realiza por tanto, de acuerdo con las presentes realizaciones, por reacción de un cuarto compuesto purificado tal como se describe anteriormente, que tiene un grupo hidroxilo libre, con un compuesto de reacción que contiene fósforo, de manera que se produce un compuesto que tiene un grupo de reacción que contiene fósforo; y conversión del grupo de reacción que contiene fósforo en la fracción que contiene fósforo.

El compuesto de reacción que contiene fósforo se selecciona de manera que tras dicha reacción, se obtiene un grupo de reacción que contiene fósforo unido a la estructura principal de glicerol. El compuesto de reacción que contiene fósforo se selecciona por tanto de manera que tenga un segundo grupo de reacción y un tercer grupo de reacción, con lo que el segundo grupo de reacción se selecciona como capaz de reaccionar con el grupo hidroxilo libre y el tercer grupo de reacción se selecciona como capaz de convertirse en la fracción que contiene fósforo.

Los grupos de reacción que son capaces de reaccionar con un grupo hidroxilo libres incluyen, por ejemplo haluros, cloruros de sulfonilo, haluros de acilo y similares.

Preferentemente el segundo grupo de reacción es haluro y más preferentemente es cloruro.

Si bien tal como se describe anteriormente, las fracciones que contienen fósforo preferibles son fracciones de fosfato, la conversión del compuesto que contiene fósforo en la fracción que contiene fósforo deseada implica normalmente una formación de un enlace éster-fosfato. Dicho enlace puede obtenerse, por ejemplo, por reacción de un derivado fosfórico como el cloruro de fosforilo con una fracción que contiene hidroxilo.

Así, de acuerdo con una realización preferida, el compuesto de reacción que contiene fósforo es oxiclورو de fósforo (POCl_3), de manera que los grupos de reacción tercero y segundo son cloruros y el compuesto que contiene un grupo de reacción que contiene fósforo tiene una estructura principal de glicerol y un residuo de cloruro de fosforilo unido al mismo.

La reacción del cuarto compuesto purificado con el oxiclورو de fósforo se lleva a cabo normalmente en presencia de una base. Las bases adecuadas incluyen bases orgánicas e inorgánicas, siendo preferidas las bases orgánicas. Así, la reacción se realiza preferentemente en presencia de una base como, por ejemplo, trietilamina (por ejemplo, trietilamina).

Esta reacción se lleva a cabo preferentemente en presencia de un disolvente, preferentemente un disolvente polar como THF.

El compuesto glicerólico que contiene cloruro de fosforilo obtenido por el proceso descrito en la presente memoria descriptiva puede convertirse fácilmente en cualquier fracción deseada que contiene fósforo y es por tanto un producto intermedio altamente beneficioso.

Así, por ejemplo, puede convertirse en ácido fosfórico mediante una simple hidrólisis del mismo, tal como se ilustra en la sección de Ejemplos que se ofrece a continuación.

Alternativamente, puede hacerse reaccionar con una fracción que contiene hidroxilo, y opcionalmente y de forma preferente también con agua, para obtener así otras fracciones de fosfato.

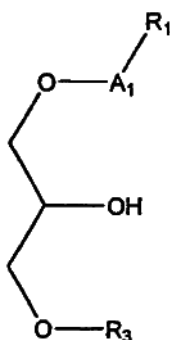
Las fracciones de fosfato preferidas que se incorporan en fosfolípidos oxidados terapéuticos (por ejemplo, fosforilcolina, fosforiletanolamina) incluyen normalmente un grupo aminoalquilo, que además puede estar alquilado en N.

La conversión del producto intermedio de cloruro de fosforilo en dichas fracciones de fosfato puede realizarse así fácilmente mediante la reacción con un derivado del grupo aminoalquilo deseado, seleccionado como capaz de reaccionar con el tercer grupo de reacción (que es un cloruro).

- 5 Así, por ejemplo, las fracciones de fosfato que contienen aminoalquilo pueden obtenerse por reacción del producto intermedio de cloruro de fosforilo con un aminoalcohol. Si se desea, el aminoalcohol puede ser alquilado posteriormente, de manera que se produzca una fracción de fosfato de aminoalquilo N-alkilada, como en el caso de una fracción de fosforilcolina.
- 10 La obtención de dicha fracción de fosfato de aminoalquilo N-alkilada unida a una estructura principal de glicerol usado el proceso descrito anteriormente es altamente beneficiosa dado que evita la necesidad de usar materiales peligrosos como la trimetilamina usada normalmente para obtener dichos compuestos.

En cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria descriptiva el residuo que contiene una fracción oxidada está unido a la posición *sn*-2 del compuesto. Así, mediante la selección y/o protección adecuada del primer compuesto, se realiza una fijación selectiva del residuo que contiene una fracción oxidada.

En la presente invención, el primer compuesto tiene por tanto la siguiente fórmula general I:



20

Fórmula I

donde:

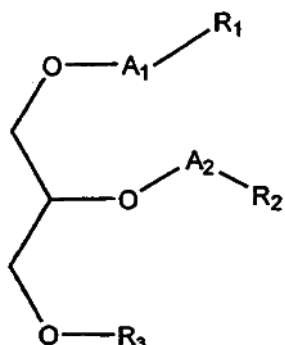
25

A₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₂ y C=O;

R₁ es un alquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono; y

- 30 R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcardiolipina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bisfosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-
- 35 fosfoetanolamina, fosfoglicerol.

Usando cualquiera de los procesos descritos anteriormente, puede obtenerse así un compuesto que tiene la siguiente Fórmula general II:



Fórmula II

5 donde:

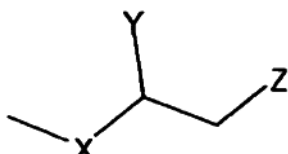
A₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₂ y C=O y es preferentemente CH₂;

A₂ es CH₂;

10

R₁ es un alquilo que tiene 1-30 átomos de carbono;

R₂ es



15

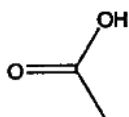
mientras:

X es una cadena de alquilo que tiene 1-24 átomos de carbono;

20

Y es hidrógeno; y

Z es



25

y

R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcardiolipina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bisfosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriammina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina, fosfoglicerol.

35

Tal como se demuestra en la sección de Ejemplos que se ofrece a continuación, los procesos descritos

anteriormente pueden usarse para producir fosfolípidos oxidados, y en particular fosfolípidos oxidados terapéuticamente beneficiosos tales como 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-fosfocolina (también conocida en la técnica y referida en la presente memoria descriptiva como CI-201). Por ejemplo, usando el proceso descrito en Ejemplo 6 mostrado más adelante, la 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-fosfocolina se produjo a una escala industrial de docenas de kg.

Los objetivos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención serán evidentes para el experto en la materia tras el análisis de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se exponen anteriormente y se reivindican en la sección de reivindicaciones mostrada más adelante encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una forma no limitativa.

(i) Preparación de un compuesto glicerolípido que tiene al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida al mismo por medio de un enlace de éter, mediante la unión de un residuo insaturado a un glicerolípido y la oxidación del enlace insaturado, a la vez que se usa un reactivo de Girard y/o cristalización de un compuesto que contiene triol para el aislamiento del producto oxidado, tal como se ilustra en el Ejemplo 1 y en los Esquemas I-V;

(ii) Preparación de un compuesto glicerolípido que tiene al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida al mismo por medio de un enlace de éter, mediante la unión de un residuo insaturado a un glicerolípido y la oxidación del enlace insaturado por medio de un producto intermedio de epóxido, a la vez que se usa un grupo protector acetoxi, tal como se ilustra en el Ejemplo 2 y en los Esquemas VI-X;

(iii) Preparación de un compuesto glicerolípido que tiene al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida al mismo por medio de un enlace de éter mediante la introducción directa de un compuesto que contiene una fracción oxidada, tal como se ilustra en el Ejemplo 3 y en el Esquema XI; y

El siguiente Ejemplo de referencia 1 ilustra la introducción de una fracción reactiva que contiene fósforo en un compuesto glicerolípido que tiene un residuo que contiene una fracción oxidada unida al mismo por medio de un enlace de éter que usa un compuesto de reacción que contiene fósforo (por ejemplo, dicloruro fosforoso) para formar un producto intermedio de reacción.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-3-fosfocolina: Se añadió una solución de 1-hexadecil-2-(5'-carboximetil)butil-glicerol (0,86 gramos), 0,34 gramos (2,6 mmoles) de trietilamina y 50 ml de tetrahidrofurano gota a gota, durante 25 minutos en una solución enfriada con hielo de 0,24 ml (0,39 gramos, 2,6 mmoles) de POCl_3 y 10 ml de tetrahidrofurano (THF). Se agitó la mezcla resultante durante 10 minutos adicionales en un baño de hielo y durante 45 minutos a temperatura ambiente (23°C). A continuación se enfrió la mezcla de reacción en un baño de hielo y se añadió una solución de etanolamina (0,16 ml) y trietilamina (0,64 ml) en THF (50 ml) gota a gota a la misma con agitación vigorosa. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales en un baño de hielo y prosiguió además a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación se filtró la mezcla de reacción y se evacuó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo en una mezcla de ácido acético (24 ml) y agua (10 ml) y se calentó la solución a 70°C durante 1 hora. Después de enfriar a temperatura ambiente, se extrajo la mezcla con cloroformo (2 x 25 ml) y se evacuó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo en una mezcla de isopropanol (50 ml) y diclorometano (18 ml). Se añadió a la misma carbonato de potasio (5,0 gramos) en agua (10 ml) y se calentó la mezcla resultante a 35-40°C. A continuación se añadió gota a gota una solución de dimetilsulfato (1 ml) en 10 ml de isopropanol gota a gota durante 45 minutos. Después de 90 minutos adicionales se extrajo la mezcla con cloroformo (3 x 50 ml) y se evacuó el disolvente a presión reducida para proporcionar 1,10 gramos de 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-3-fosfocolina (92% de rendimiento).

Preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-fosfocolina: Se disolvió 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-3-fosfocolina en metanol (25 ml). Se añadió hidróxido de sodio (1,0 gramos) disuelto en metanol al 90% (20 ml) a la solución metanólica y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 horas. Se ajustó el pH de la reacción a 4 añadiendo dihidrogenofosfato de sodio. Se añadió agua (50 ml) y cloroformo (50 ml), se recogió la fase orgánica y se evacuó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo en cloroformo, se secó sobre Na_2SO_4

anhidro, se filtró y se evacuó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-fosfocolina (0,71 gramos) (66% de rendimiento).

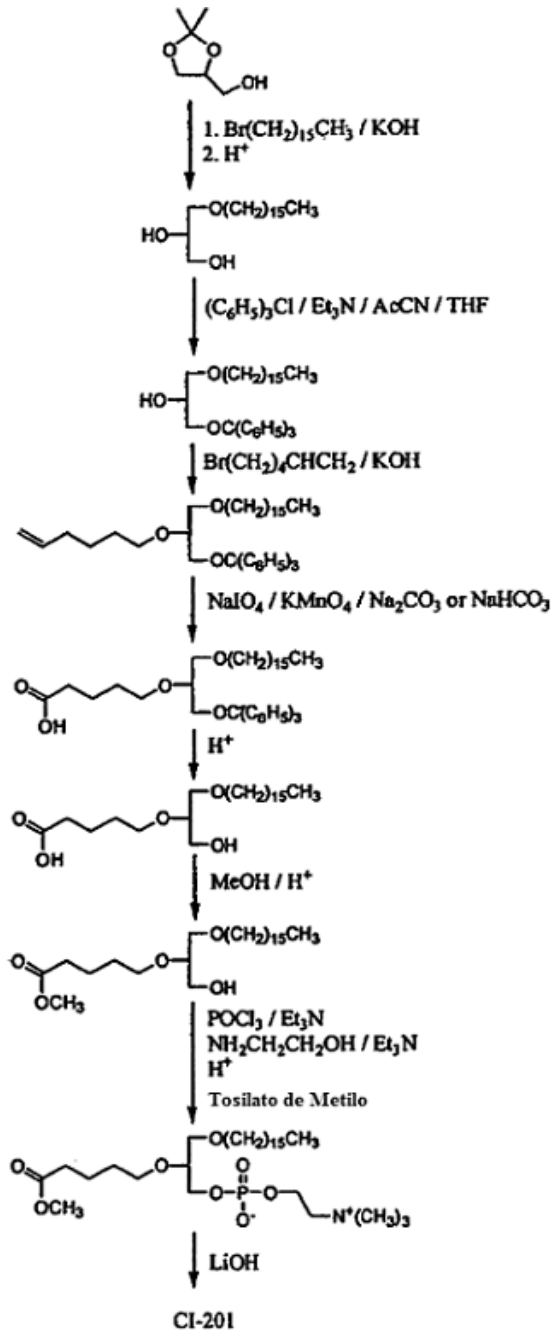
EJEMPLO 2

5

Preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-fosfocolina (CI-201) por medio de oxidación directa de un enlace insaturado (un proceso de escala ampliable)

En el Esquema I mostrado a continuación se muestra un proceso de preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-
10 fosfocolina (CI-201), que puede prepararse fácilmente a mayor escala para fabricación industrial del producto:

Esquema I



5

En este proceso, el 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritiloglicerol se oxida directamente para obtener el ácido carboxílico correspondiente en un procedimiento de una etapa, evitando así la necesidad de realizar la oxidación por medio de un procedimiento de varias etapas que requiere separaciones laboriosas de los productos intermedios. La etapa de oxidación se realiza usando agentes oxidantes seguros, eficaces y menos peligrosos. Los procedimientos de purificación de todos los productos intermedios se realizan a la vez que se evita el uso de la cromatografía en columna inaplicable industrialmente.

10

Este proceso se realizó eficazmente a mayor escala, para fabricar industrialmente CI-201.

Preparación de 1-hexadecil-glicerol: Se agitó (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol (11 gramos), hidróxido de potasio en polvo (20 gramos) y bromuro de hexadecilo (27,96 gramos) en tolueno (150 ml) y se sometió a reflujo durante 6 horas, a la vez que se evacuaba el agua formada por destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 40 ml. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente; se añadió agua (100 ml) y se extrajo la mezcla resultante con diclorometano (3 x 75 ml). Se lavó con agua (50 ml) la fase orgánica combinada y se evacuó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo en 200 ml de mezcla de metanol:agua:ácido clorhídrico concentrado 90:10:5 (v/v) y se sometió a reflujo la solución resultante durante 2 horas, seguido por enfriamiento a temperatura ambiente y adición de agua (100 ml). Se extrajo el producto con diclorometano (3 x 100 ml), y se lavó la fase orgánica consecutivamente con agua (100 ml), solución acuosa saturada de carbonato de sodio (100 ml) y de nuevo con agua (100 ml). Se evacuó el disolvente a presión reducida y se cristalizó el producto a partir de hexano (200 ml) para proporcionar 21,69 gramos (rendimiento del 82%) de 1-hexadecil-glicerol puro, tras secar en un desecador a presión reducida.

Preparación de 1-hexadecil-3-tritilo-glicerol: Se colocó 1-hexadeciloxi-glicerol (20 gramos) y trifetilclorometano (21,29 gramos) en THF seco (369 ml) y acetonitrilo seco (93 ml). Se añadió trietilamina (17,75 ml) y se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 17 horas. Posteriormente se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se vertió en hielo (100 gramos), se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con éter. Se lavó la fase orgánica consecutivamente con agua (200 ml), H₂SO₄ diluido (1,5%) (2 x 200 ml), agua (200 ml), bicarbonato de sodio acuoso saturado (200 ml) y de nuevo con agua (200 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evacuó el disolvente a presión reducida para proporcionar 36,86 gramos de producto en bruto.

Se disolvió el residuo en hexano caliente (200 ml) y se enfrió la solución resultante a 4°C durante toda la noche. Se filtró el precipitado resultante para producir 23,77 gramos del compuesto purificado. Se recogió el producto purificado adicional por evacuación del disolvente de las aguas madres a presión reducida y disolviendo el residuo de nuevo en hexano caliente (50 ml). Se enfrió la solución resultante a 4°C durante toda la noche y se filtró el precipitado para producir 6,94 gramos adicionales del producto y una cantidad total de 30,71 gramos.

Preparación de 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritiloglicerol: Se agitó 1-hexadecil-3-tritiloglicerol (19,94 gramos), 6-bromo-1-hexeno (6,98 gramos, 5,73 ml) e hidróxido de potasio en polvo (15 gramos) en hexano (350 ml) y se sometió a reflujo durante 8 horas, mientras se evacuaba el agua formada por destilación azeotrópica. A continuación se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con agua (2 x 200 ml). Posteriormente se evacuó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en hexano (150 ml) y se lavó de nuevo con agua (2 x 200 ml). Se mantuvo la solución orgánica a 4°C durante toda la noche, durante la cual se produjo la precipitación de los subproductos. La filtración y la evacuación del disolvente a presión reducida produjeron 19,86 gramos (86,6% de rendimiento) de 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritiloglicerol.

Preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-sn-glicerol: En un matraz de base redonda de tres bocas equipado con termómetro y embudo de decantación, se puso en suspensión peryodato de sodio (150,16 gramos, 702 mmol, 9 equivalentes) en 500 ml de agua. Después de la adición de bicarbonato de sodio (7,21 gramos, 85,8 mmol, 1,1 equivalentes) y permanganato de potasio (2,47 gramos, 15,6 mmol, 0,2 equivalentes), se calentó la suspensión a 40°C. Se disolvió el 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritiloglicerol (50,00 gramos, 78,0 mmol) en terc-butanol (500 ml) y se añadió la solución a la mezcla de NaIO₄/KMnO₄ durante 1 hora. Después de 1,5 horas, el análisis por TLC reveló una conversión del 80%. Se añadió una cantidad adicional de permanganato de potasio (0,62 gramos, 3,9 mmol, 0,05 equivalentes) y se agitó la mezcla durante 1,5 horas. El análisis por TLC reveló menos del 5% del material de partida. A continuación se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se transfirió a un embudo de decantación.

Se extrajo el 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-tritiloglicerol intermedio con hexano (200 ml). Se lavó la fase orgánica con una solución de Na₂S₂O₅ (15 gramos) en 100 ml de agua. Se añadió ácido clorhídrico diluido (0,65 de ml de HCl concentrado en 13 ml de agua) a la fase orgánica y se destilaron 200 ml del disolvente a presión reducida. Se calentó la solución transparente restante a 80°C durante 6 horas. El análisis por TLC reveló menos del 5% de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-tritiloglicerol intermedio. Se destiló el volumen adicional de 250 ml de disolvente.

Se trató el residuo con 100 ml de agua y 10 ml de NaOH al 30% para alcanzar un pH = 12. Se filtró el trifenilmetanol precipitado y se lavó 4 veces con 10 ml de agua. Se extrajo el filtrado con una mezcla de 50 ml de hexano y 50 ml de acetato de etilo para evacuar el trifenilmetanol remanente y otras impurezas. Se protonó la sal de sodio de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-sn-glicerol, presente en la fase acuosa, con ácido clorhídrico concentrado (8,45 ml,

101,4 mmol, 1,3 equivalentes, pH = 1). Se extrajo el ácido carboxílico libre resultante con hexano (100 ml). La evaporación hasta sequedad y la coevaporación con 100 ml de hexano produjeron 27,00 gramos de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-*sn*-glicerol en bruto.

- 5 Se cristalizó el producto en bruto disolviendo en una mezcla de acetona y hexano (7 ml/68 ml) y enfriando a 0°C. Se filtró el precipitado y se lavó con hexano en frío (2 x 7 ml) y se secó. Se obtuvo el 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-*sn*-glicerol como un sólido blanquecino (20,90 gramos, 50,2 mmol, 64,3% de rendimiento).

- Preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-*sn*-glicerol:** Se disolvió 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-*sn*-glicerol (15,0 gramos, 36,0 mmol) en metanol (100 ml) y se añadió ácido clorhídrico concentrado (3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se añadió trietilamina hasta que la mezcla de reacción alcanzó un pH = 7. Se transfirió la solución a un embudo de decantación y se extrajo con hexano (2 x 200 ml). Se lavó la fase orgánica con agua y la evaporación hasta sequedad y la coevaporación con 100 ml de hexano produjeron 14,92 gramos de 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-*sn*-glicerol (34,65 mmol, 96,2% de rendimiento).

- 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina:** Se añadió una solución de 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-glicerol (8,60 gramos, 19,97 mmol) y trietilamina (2,63 gramos, 3,62 ml, 26 mmol) en 500 ml de THF gota a gota, durante 25 minutos, en una solución enfriada con hielo de POCl₃ (3,90 gramos, 2,40 ml, 26 mmol) en 100 ml de THF. Se agitó la mezcla resultante durante 10 minutos adicionales en un baño de hielo y durante 45 minutos a temperatura ambiente (23°C). A continuación se añadió una solución de etanolamina (1,6 ml) y trietilamina (6,4 ml) en THF (500 ml) gota a gota con agitación vigorosa a una mezcla de reacción enfriada con hielo. Se continuó con la agitación durante 10 minutos adicionales en un baño de hielo y se prosiguió a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se filtró la mezcla de reacción y se evacuó el disolvente a presión reducida.
- 25 Se disolvió el residuo en una mezcla de ácido acético (24 ml) y agua (100 ml) y se calentó a 70°C durante 1 hora. Posteriormente se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se extrajo con diclorometano (2 x 250 ml). Se evacuó el disolvente a presión reducida, para producir 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina en bruto.

- 30 Se disolvió la 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina en bruto en una mezcla de isopropanol (500 ml) y diclorometano (180 ml). Se añadió una solución de carbonato de potasio (50 gramos) en agua (100 ml) para alcanzar un pH superior 11, y se mantuvo la solución a 35-40°C durante la adición gota a gota de metiltosilato (11,15 gramos) en 100 ml de isopropanol en un periodo de tiempo de 45 minutos. Después de 90 minutos más, se acidificó la mezcla con ácido clorhídrico. Se añadió agua (100 ml) y diclorometano (550 ml) y se separaron las fases.
- 35 Se lavó la fase orgánica con agua (100 ml) y se evacuó el disolvente a presión reducida para proporcionar 11,0 gramos de 1-hexadecil-2-(5'-carboximetil)butil-3-fosfocolina (18,46 mmol, 92,45% de rendimiento).

- Preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-fosfocolina:** Se disolvió 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-3-fosfocolina en isopropanol (250 ml). Se añadió hidróxido de litio monohidratado (1,68 gramos) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se evaporó parcialmente el isopropanol por destilación y se llevó el pH de la reacción a valor ácido con adición de ácido clorhídrico. Se añadió agua (250 ml) y se extrajo la solución con diclorometano (2 x 250 ml). Posteriormente se evacuó el disolvente a presión reducida y se coevaporó con diclorometano para proporcionar la 1-hexadecil-2-(5'-carboxi)butil-3-fosfocolina en bruto.

- 45 Se purificó la 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-fosfocolina en bruto por cromatografía sobre columna de gel de sílice. Se usó diclorometano seguido por una mezcla de diclorometano, metanol, agua y trietilamina para eluir el producto de la columna. Se combinaron las fracciones que contenían el producto y se evaporaron. Se secó al vacío el producto resultante. Se obtuvieron 7,10 gramos de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-3-fosfocolina pura (12,2 mmol, 66,1% de rendimiento).

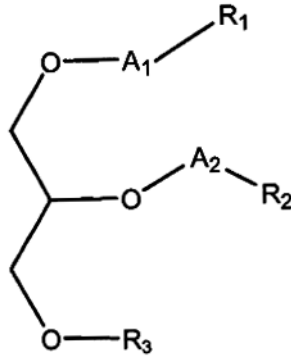
50

Debe indicarse que algunas características de la invención que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones independientes, pueden proporcionarse también en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención que, por brevedad, se describen en contexto de una única realización, también pueden proporcionarse de forma separada o en cualquier subcombinación adecuada.

55

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter, teniendo el compuesto la fórmula general II:



Fórmula II

10

donde:

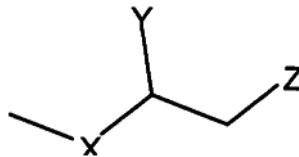
A₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₂ y C=O;

15 A₂ es CH₂;

R₁ es un alquilo que tiene 1-30 átomos de carbono;

R₂ es

20



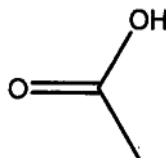
mientras:

25 X es una cadena de alquilo que tiene 1-24 átomos de carbono;

Y es hidrógeno; y

Z es

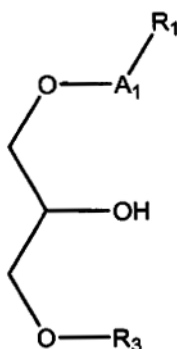
30



Y

R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bisfosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina, fosfoglicerol, comprendiendo el procedimiento:

10 suministro de un primer compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un grupo hidroxilo libre, teniendo dicho primer compuesto la Fórmula general I:



15

Fórmula I;

donde A₁ y R₁ son tal como se definen para la Fórmula II, y R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo;

20 suministro de un segundo compuesto que tiene al menos un enlace insaturado que puede someterse a escisión oxidativa, y al menos un grupo de reacción capaz de formar un enlace de éter con dicho grupo hidroxilo libre;

reacción de dicho primer compuesto y dicho segundo compuesto para obtener así un tercer compuesto, teniendo dicho tercer compuesto dicha estructura principal de glicerol y estando un residuo que contiene un enlace insaturado

25 unido a dicha estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter en la posición *sn*-2;

donde cuando R₃ de dicho primer compuesto es hidrógeno, el procedimiento además comprende, antes de la reacción de dicho primer compuesto y dicho segundo compuesto, la protección de un grupo hidroxilo libre en la posición *sn*-3 de dicha estructura principal de glicerol con un grupo protector, de manera que dicho compuesto

30 comprende dicho grupo protector en dicha posición *sn*-3;

recogida de dicho tercer compuesto;

suministro de una solución de dicho tercer compuesto en un disolvente no polar, estando dicho disolvente no polar seleccionado de manera que dicho tercer compuesto es soluble en el mismo cuando las impurezas formadas durante dicha reacción son insolubles en el mismo, para proporcionar así una mezcla que incluye dicha solución de dicho tercer compuesto en dicho disolvente no polar e impurezas insolubles;

eliminación de las impurezas insolubles; y

40

eliminación de dicho disolvente no polar, para obtener así un tercer compuesto purificado;

reacción de dicho tercer compuesto purificado con un agente oxidante que comprende una mezcla de un peryodato y un permanganato que manera que dicho enlace insaturado se oxida para formar dicho Z, para obtener así un

45 cuarto compuesto, teniendo dicho cuarto compuesto dicha estructura principal de glicerol y un residuo que contiene una fracción oxidada unida a dicha estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter en la posición *sn*-

2; y

aislamiento de dicho cuarto compuesto usando separación de fases para obtener así un cuarto compuesto purificado, obteniendo así el compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que
5 contiene una fracción oxidada unida a dicha estructura principal de glicerol por medio de un enlace de éter,

estando dicho aislamiento de dicho tercer compuesto y dicho aislamiento de dicho cuarto compuesto desprovistos de cromatografía en columna,

10 donde cuando el compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la estructura principal de glicerol comprende además una fracción que contiene fósforo unida a la estructura principal de glicerol, de manera que R_3 se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol,
15 fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bisfosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina, fosfoglicerol,

el procedimiento comprende además, después del aislamiento de dicho cuarto compuesto:

20 suministro de dicho cuarto compuesto purificado que tiene un grupo hidroxilo libre;

reacción de dicho cuarto compuesto purificado con un compuesto de reacción que contiene fósforo que tiene un segundo grupo de reacción y un tercer grupo de reacción, siendo dicho segundo grupo de reacción capaz de
25 reaccionar con dicho grupo hidroxilo libre, para proporcionar así dicho cuarto compuesto purificado que tiene un grupo de reacción que contiene fósforo unido a la estructura principal de glicerol; y

conversión de dicho grupo de reacción que contiene fósforo a dicha fracción que contiene fósforo.

30 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha reacción de dicho tercer compuesto purificado con un agente oxidante se efectúa en presencia de una base.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha base se selecciona de entre el grupo que consiste en un bicarbonato y un carbonato.
35

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además, después de la reacción de dicho tercer compuesto con dicho agente oxidante, la eliminación de dicho grupo protector.
40

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde la eliminación de dicho grupo protector y el aislamiento de dicho cuarto compuesto se realizan simultáneamente.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además, después de la reacción de dicho tercer compuesto con dicho agente oxidante:
45

recogida de dicho cuarto compuesto;

suministro de una solución de dicho cuarto compuesto en un disolvente, seleccionándose dicho disolvente de manera que dicho cuarto compuesto es soluble en el mismo cuando las impurezas formadas durante dicha reacción
50 son insolubles en el mismo, y de manera que se realiza además la eliminación de dicho grupo protector en dicho disolvente y dicho grupo protector es insoluble en el mismo, para proporcionar así una mezcla que incluye dicha solución de dicho cuarto compuesto en dicho disolvente, y grupo protector insoluble e impurezas insolubles;

eliminación de dichas impurezas insolubles y dicho grupo protector; y

55 eliminación de dicho disolvente, obteniendo así dicho cuarto compuesto purificado.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el compuesto que tiene una estructura principal de glicerol y al menos un residuo que contiene una fracción oxidada unida a la

estructura principal de glicerol comprende además una fracción que contiene fósforo unida a la estructura principal de glicerol, de manera que R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bisfosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina, fosfoglicerol,

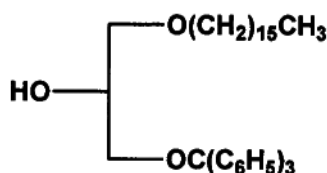
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho compuesto de reacción que contiene fósforo es oxiclورو de fósforo (POCl₃).

10

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

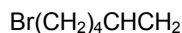
(i) reacción de dicho primer compuesto que tiene una estructura principal de glicerol, donde un grupo hidroxilo en la posición *sn*-3 de la estructura principal de glicerol está protegido con un grupo tritilo, teniendo dicho primer compuesto la fórmula:

15



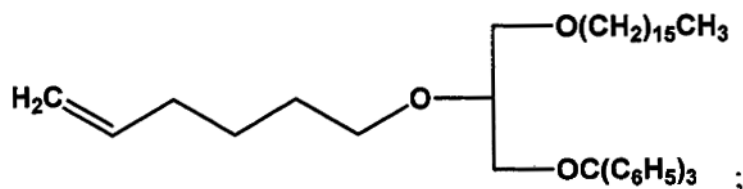
donde dicho segundo compuesto tiene un enlace insaturado y tiene la fórmula:

20



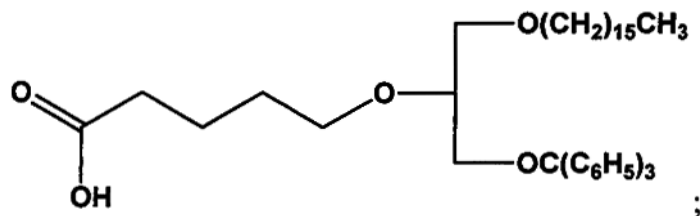
para obtener dicho tercer compuesto que tiene la fórmula:

25

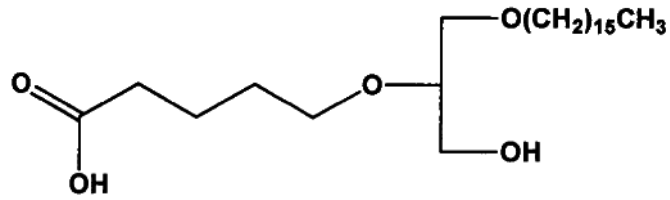


(ii) suministro de la solución de dicho tercer compuesto y eliminación de impurezas insolubles de dicha solución para obtener dicho tercer compuesto purificado;

30 (iii) reacción de dicho tercer compuesto purificado con una mezcla de peryodato y permanganato para formar un compuesto intermedio que tiene la fórmula:



35 (iv) eliminación de dicho grupo tritilo formando así dicho 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-glicerol que tiene la fórmula:

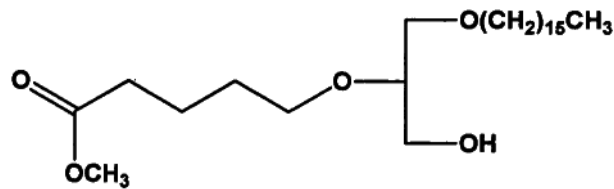


y

5 (v) aislamiento de dicho 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-glicerol usando separación de fases para obtener 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-glicerol aislado como el compuesto de fórmula II.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además:

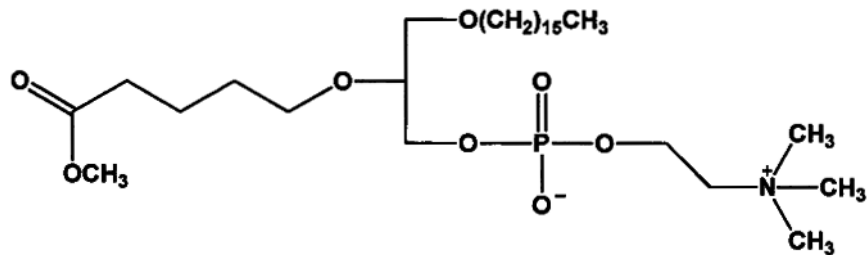
10 (vi) reacción del 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-glicerol aislado por medio de un compuesto de éster de metilo que tiene la fórmula:



15 con POCl_3 , formando así el compuesto que tiene un grupo de reacción que contiene fósforo unido a la estructura principal de glicerol, y

(vii) conversión del grupo de reacción que contiene fósforo en una fracción que contiene fósforo para formar un compuesto que incorpora una fracción de fosfocolina que tiene la fórmula:

20



(viii) hidrólisis de dicha fracción de éster de metilo de dicho compuesto que incorpora una fracción de fosfocolina formando así 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina como el compuesto de fórmula II.